

Molekulární biotechnologie č.10a

Využití poznatků molekulární biotechnologie. Molekulární diagnostika.

Využití molekulární biotechnologie – v mnoha oblastech

- Molekulární diagnostika
- Bioremediace a využití biomasy
- Využití škrobu a sacharidů, utilizace celulózy
- Mikrobiální insekticidy
- Baktérie stimulující růst rostlin
- Vakcíny a terapeutické proteiny.
- Příprava a využití transgenních rostlin. Nové potraviny.
- Příprava a využití transgenních zvířat.
- Genová terapie lidských somatických buněk.

Molekulární diagnostika

- Diagnostikuje specifické molekuly
- virů, bakterií, hub, parazitů u lidí, zvířat, rostlin,
- v klinickém materiálu, ve vodě, v odpadech, v potravinách apod.

Srovnání různých diagnostických metod (Glick a spol. 2003)

Table 9.1 A comparison of some of the methods used to diagnose parasite infection

Method	Advantages	Disadvantages
Microscopic examination	Simple Direct detection of parasite Differentiates morphologically distinct organisms	Slow, laborious, and tedious Low sensitivity Cannot discriminate between similar organisms Requires a high skill level
In vitro culture and mouse inoculation	Detects only viable parasites Measures virulence and infectivity	Slow and expensive Different strains show a range of responses Parasite may lose its viability in the specimen Uses animals
Detection of antibodies in serum	Simple and fast Automatable Can be used to screen a large number of samples	Not always specific Does not distinguish between active and latent infections
DNA hybridization and PCR	Fast, sensitive, and specific Detects parasite directly Can distinguish different species Independent of previous infections Parasites need not be viable Automatable	Expensive and multistep Does not distinguish between live and dead organisms Possible false positives and false negatives

Adapted from Weiss, *Clin. Microbiol. Rev.* 8:113–130, 1995.

Molekulární diagnostika je vysoce

- Specifická tj. pozitivní pouze pro hledanou molekulu (buňku) v nadbytku ostatních molekul
- Citlivá (senzitivní) tj. umožňuje identifikaci malého množství molekul (buněk), nejlépe jednu
- Jednoduchá a levná z důvodu praktického využití

Využívá zejména

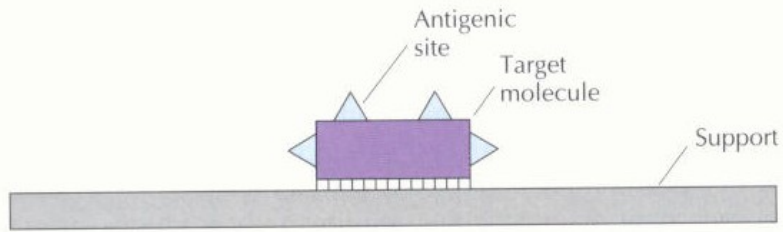
- vysoké afinity protilátek k antigenům (imunodiagnostické metody)
- DNA/DNA hybridizace komplementárních sekvencí DNA a DNA amplifikace (metody analýzy DNA)

Imunodiagnostická metoda

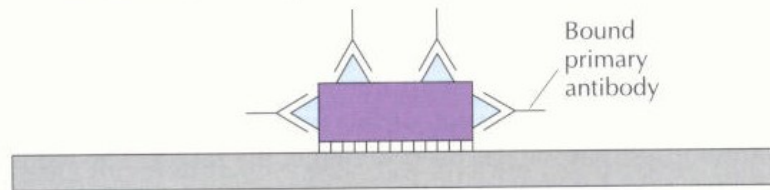
- ELISA – enzyme linked immunosorbent assay - pro detekci specifického antigenu
- Cílová molekula (bakteriální buňka s antigeny - povrchové molekuly vyvolávající v organismu tvorbu protilátek) je imobilizována na mikrotitrační destičce
- Na antigen se váže primární protilátka (přítomná např. ve vzorku krevního séra)
- Na primární protilátku se váže sekundární protilátka s kovalentně navázaným (konjugovaným) enzymem
- Enzym reaguje se substrátem za vzniku zabarvení (pozitivní reakce)

antibody is often obtained from rabbits that have been immunized with the target antigen, while the secondary antibody is from goats immunized with rabbit antibodies. The enzyme (E) is conjugated to the secondary antibody.

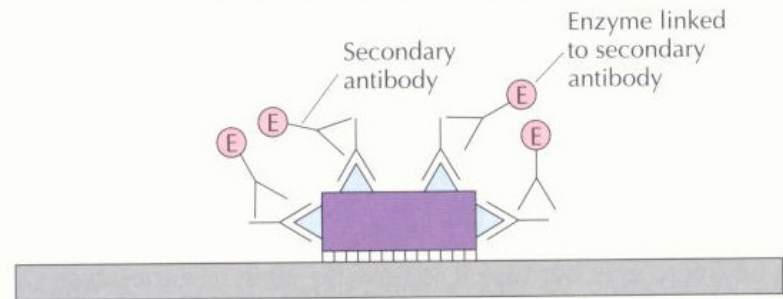
A Bind sample to support



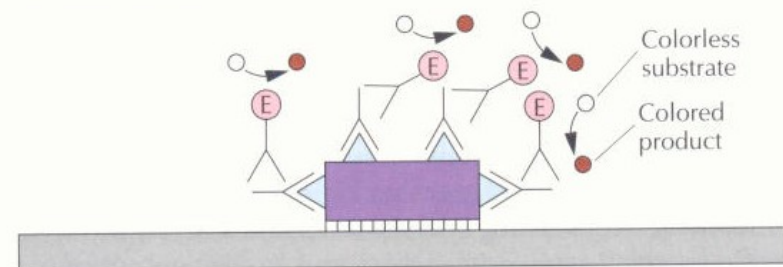
B Add primary antibody; wash



C Add secondary antibody-enzyme conjugate; wash



D Add substrate



ick a spol. 2003)

Protilátka – glykoprotein (imunoglobulin)

- Je produkována jako odpověď organismu na stimulaci imonogenem
- Vyznačuje se schopností reagovat *in vitro* a *in vivo* specificky a selektivně s antigenními determinanty imunogenu, který vyvolal její produkci
- V přírodě se protilátky tvoří v krevních buňkách savců jako reakce na infekce – protilátky polyklonální

Antigen s 7 různými antigenními determinantami vyvolá tvorbu polyklonální protilátky (Glick a spol. 2003)

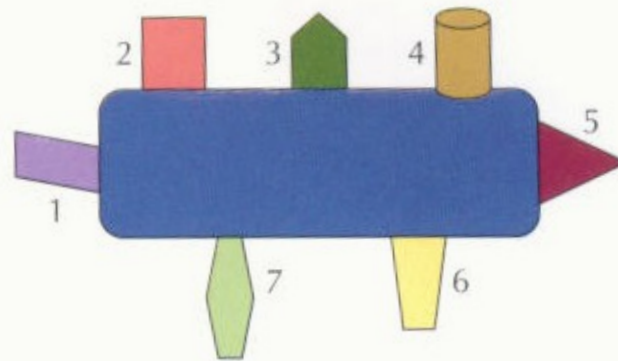


Figure 9.2 Schematic representation of a target antigen. The surface of the antigen depicted has seven (numbered 1 to 7) different antigenic determinants (epitopes). When this antigen is used to immunize an animal, each antigenic determinant elicits the synthesis of a different antibody. Together, the different antibodies that interact with an antigen constitute a polyclonal antibody directed against that antigen.

Dva druhy protilátek

- Polyklonální
- Monoklonální – soubor molekul specifických pro jeden epitop
- jsou produkovány hybridomy

Selekcce hybridomů (Glick a spol. 2003) (spleen – slezina)

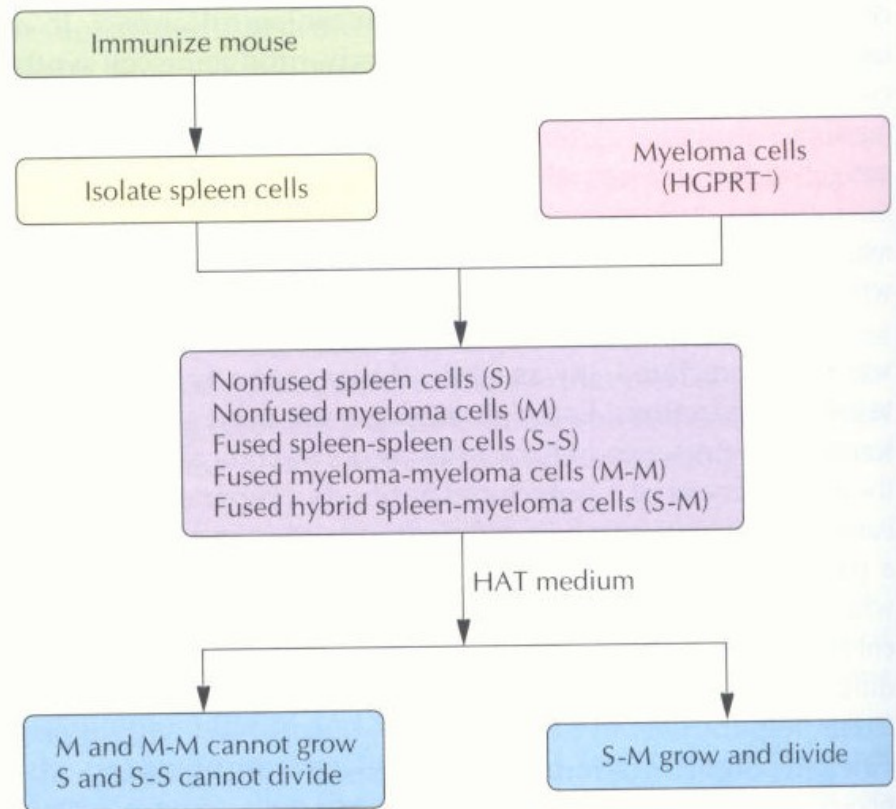


Figure 9.3 The HAT procedure for selecting hybrid spleen-myeloma (hybridoma) cells.

Produkce monoklonálních protilátek hybridomy (Glick a spol. 2003)

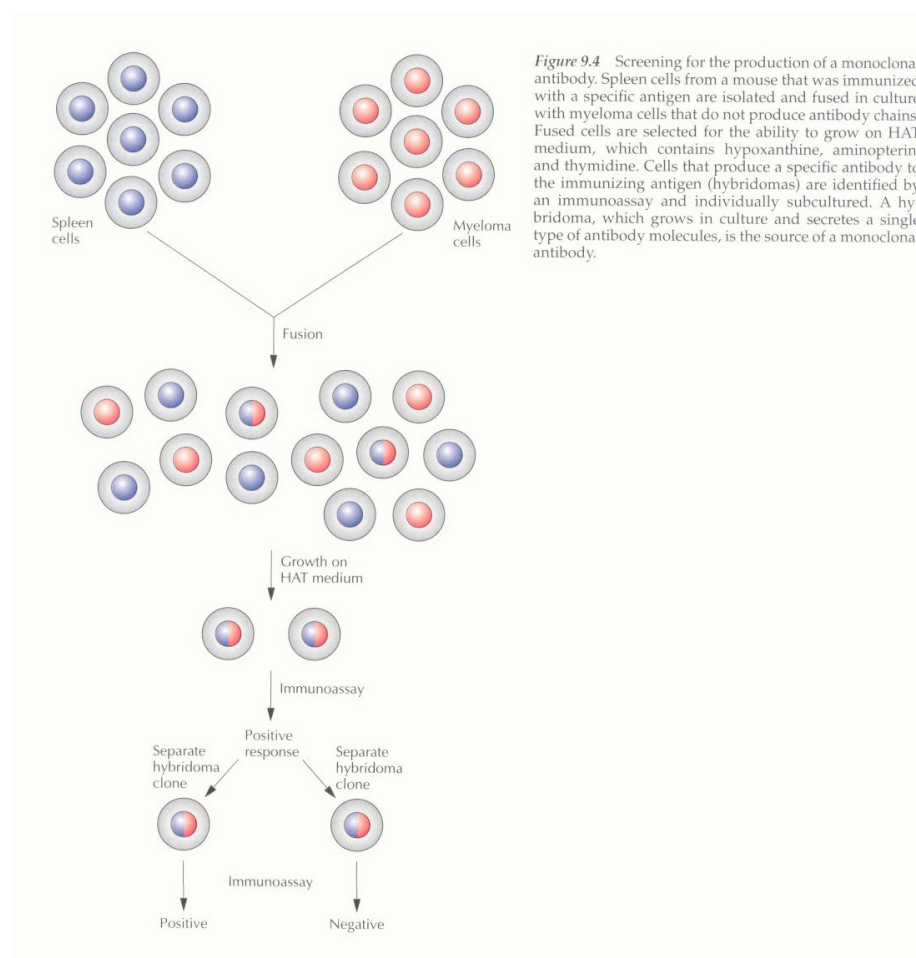


Figure 9.4 Screening for the production of a monoclonal antibody. Spleen cells from a mouse that was immunized with a specific antigen are isolated and fused in culture with myeloma cells that do not produce antibody chains. Fused cells are selected for the ability to grow on HAT medium, which contains hypoxanthine, aminopterin, and thymidine. Cells that produce a specific antibody to the immunizing antigen (hybridomas) are identified by an immunoassay and individually subcultured. A hybridoma, which grows in culture and secretes a single type of antibody molecules, is the source of a monoclonal antibody.

Monoklonální protilátky jsou používány v diagnostice (Glick a spol. 2003)

POLYPEPTIDE HORMONES

Chorionic gonadotropin
Growth hormone
Luteinizing hormone
Follicle-stimulating hormone
Thyroid-stimulating hormone
Prolactin

TUMOR MARKERS

Carcinoembryonic antigen
Prostate-specific antigen
Interleukin-2 receptor
Epidermal growth factor receptor

CYTOKINES

Interleukins 1–8
Colony-stimulating factor

DRUG MONITORING

Theophylline
Gentamicin
Cyclosporin

MISCELLANEOUS TARGETS

Thyroxine
Vitamin B₁₂
Ferritin
Fibrin degradation products
Tau protein

INFECTIOUS DISEASES

Chlamydia
Herpes
Rubella
Hepatitis B
Legionella
HIV

Figure 9.5 Targets for diagnostic monoclonal antibodies. HIV, human immunodeficiency virus.

Protilátky

- Mohou být komerčně syntetizovány v *E. coli*
- V nich jsou klonovány geny kódující jednotlivé řetězce imunoglobulinů

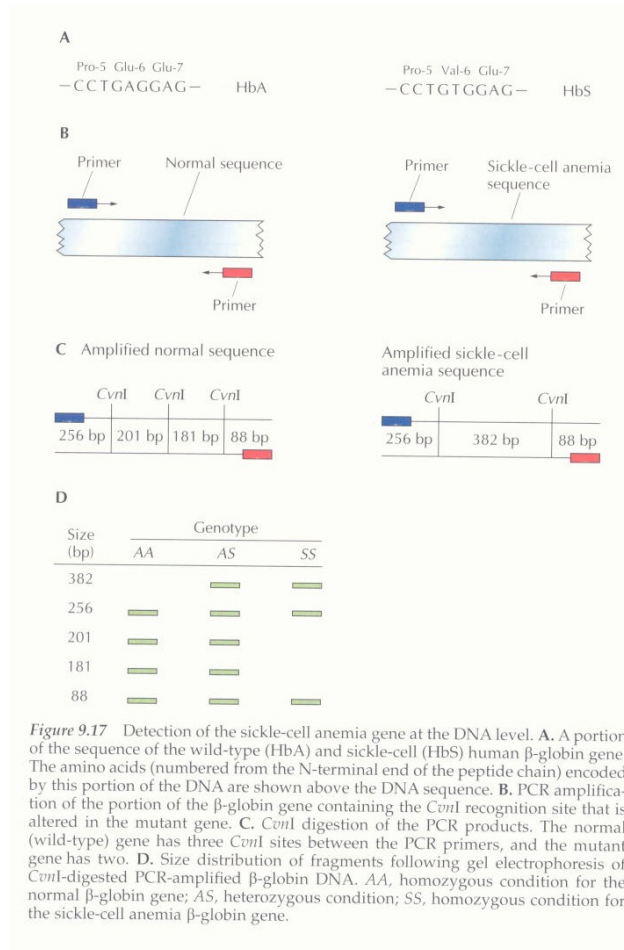
DNA diagnostické systémy

- Jsou založeny na hybridizacích komplementárních řetězců nukleových kyselin
- Jedná se o hybridizaci sond (značených jednořetězcových molekul)
- O hybridisaci specifických oligonukleotidů a amplifikaci molekul DNA (s následnou analýzou)

Detekce genu zodpovědného za srpkovou anémii se skládá z těchto kroků

- Amplifikaci cílové sekvence DNA
- její štěpení restriktázou
- separace fragmentů pomocí gelové elektroforézy na agaróze
- Analýza amplikonů

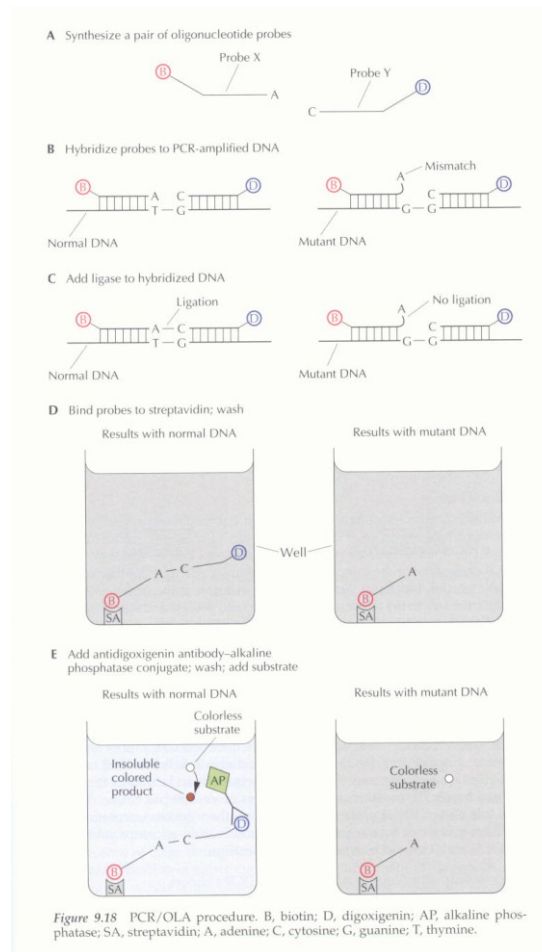
Detekce srpkové anémie pomocí PCR a analýzy amplikonu



Pomocí DNA sond

- S využitím ligace
- Lze detekovat jednobodové mutace
- Metoda PCR/OLA (oligonucleotide ligation assay)

Detekce jednobodové mutace v genu (Glick a spol. 2003)



Při detekci cílových molekul DNA

- Se využívá afinitních molekul
- Biotin (avidin) a streptavidin
- Na streptavidin lze navázat další biotiny s přikongugovaným enzymem
- Detekuje se činnost enzymu

Detekce biotinem značené cílové DNA (Glick a spol. 2003)

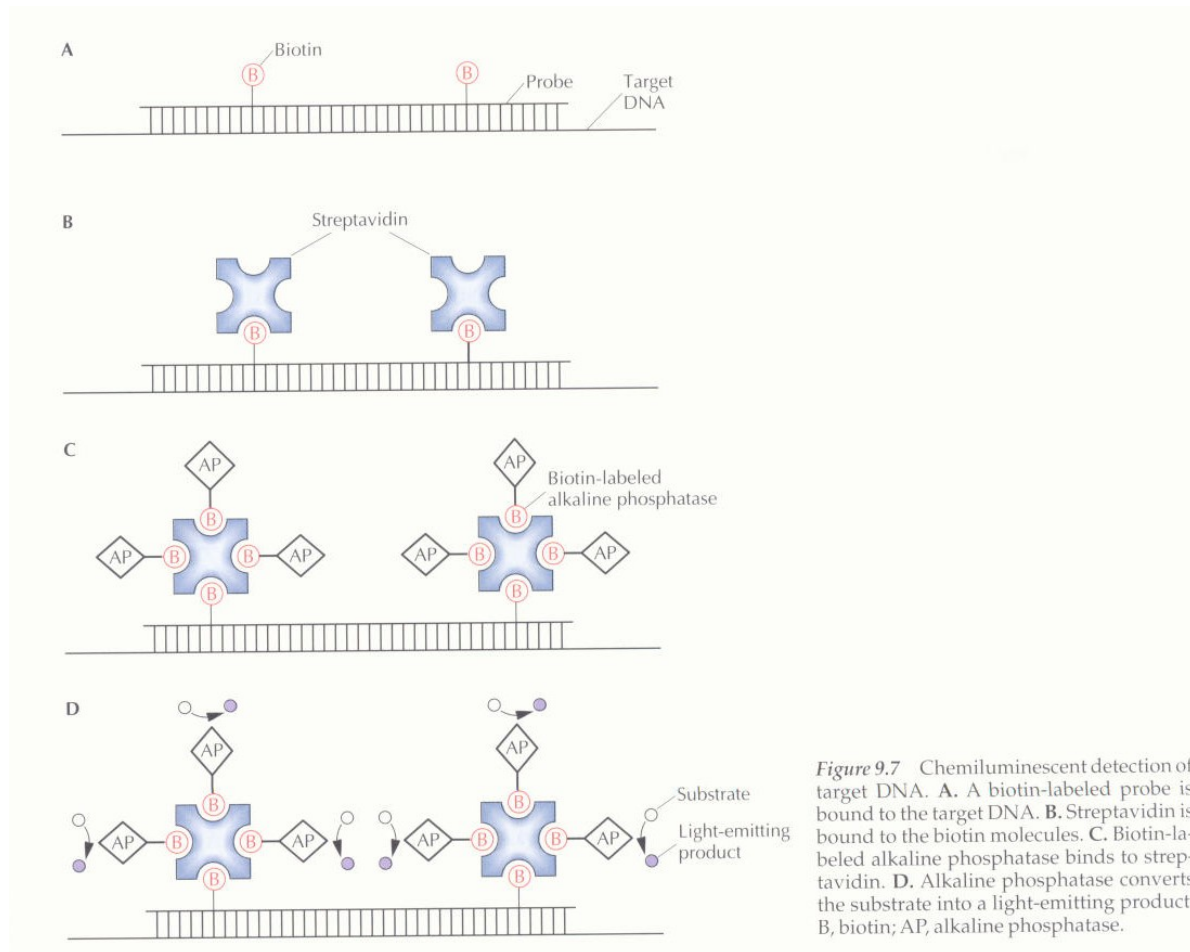


Figure 9.7 Chemiluminescent detection of target DNA. **A.** A biotin-labeled probe is bound to the target DNA. **B.** Streptavidin is bound to the biotin molecules. **C.** Biotin-labeled alkaline phosphatase binds to streptavidin. **D.** Alkaline phosphatase converts the substrate into a light-emitting product. B, biotin; AP, alkaline phosphatase.

Southern bloty a DNA/DNA hybridisace

- Nacházejí uplatnění v kriminalistice

Využití Southern blotu a DNA/DNA hybridizace v kriminalistice (Glick a spol. 2003)

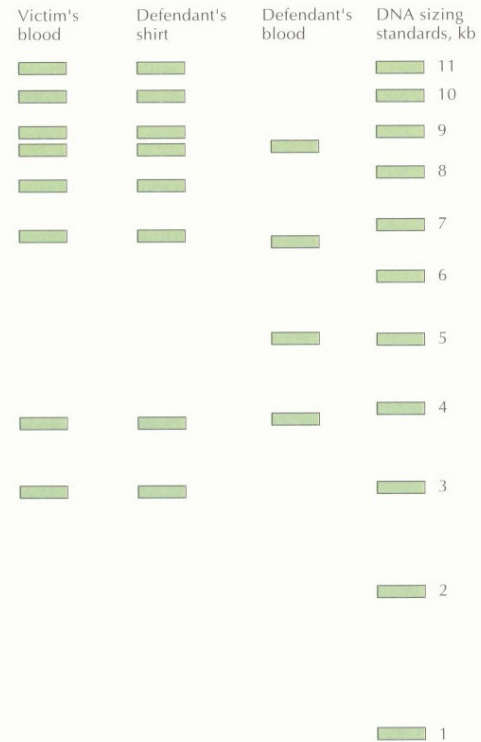


Figure 9.12 Southern blot of a forensic DNA sample. The DNA samples from the victim, the defendant's shirt, and the defendant were treated with the same restriction enzyme. Here, the banding pattern of the DNA extracted from the blood on the defendant's shirt is identical to the victim's DNA banding pattern and different from the defendant's pattern. The sizes of the DNA molecules in these bands are estimated by comparison with the positions of the sizing standards.

DNA analýza se využívá v šlechtitelství

- Při rozlišení kultivarů

Rozlišení kultivarů

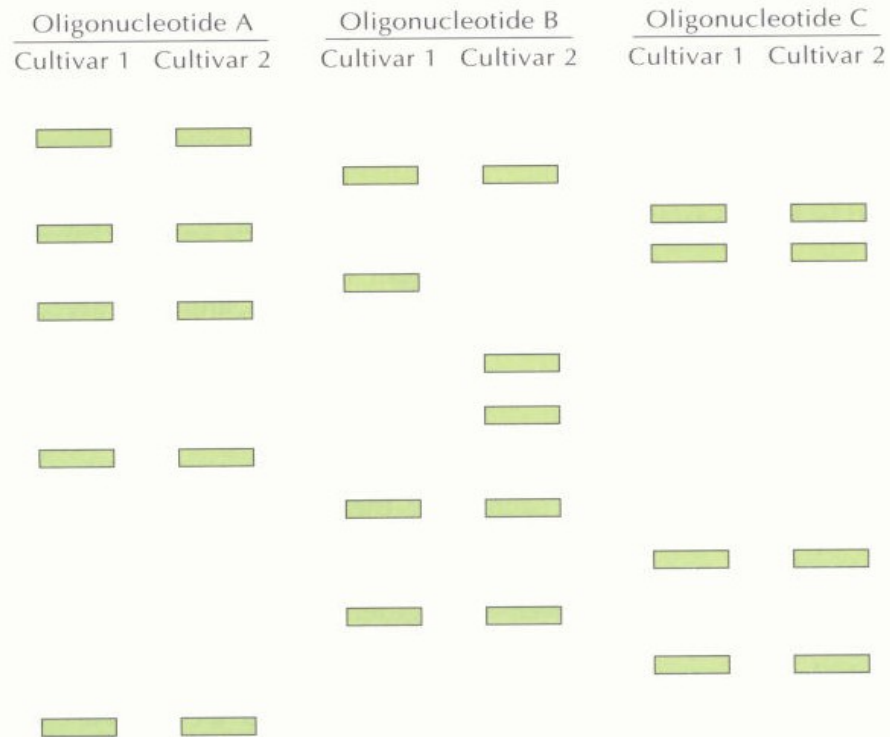


Figure 9.15 Ethidium bromide-stained bands following polyacrylamide gel electrophoresis of PCR-amplified plant DNA. Three separate oligonucleotides were used to amplify fragments from each of the two cultivars. Cultivars 1 and 2 show identical patterns of bands with oligonucleotides A and C. However, they have different patterns when oligonucleotide B is used; hence, oligonucleotide B can be used to distinguish between cultivars 1 and 2.